

## Burgonyagumók arginintartalmának meghatározása

KORPÁCZY ISTVÁN

*Élelmész- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest*

A Kisvárdai Kísérleti Gazdasággal karöltve végzett burgonyavizsgálataink során a burgonyanemesítők részéről felmerült az a kívánság, hogy szükség lenne olyan gyors, a helyszínen is elvégezhető reakcióra, amellyel az egyes gumók arginintartalmát becslésszerűen összelehesse hasonlítani. Ily módon a nagyobb arginin tartalmú gumók további nemesítés végett kiválogathatók lennének. A burgonyanövény ellenállóképessége a növényi betegségekkel szemben ugyanis összefüggésben van arginintartalmával. A kísérleteket elvállaltuk és munkánk sikerrel járt. Sakaguchi [2] reakciója bizonyult az említett célra alkalmasnak. A sokféle módosítás közül Weber [4], illetve a vele közeli rokonságban álló Acher és Crocker [1], valamint Zalta és Khouvine [6] módosítások váltak be. E három módosítás közül Zalta és Khouvine [6] módszere bizonyult a legérzékenyebbnek és legmegbízhatóbbnak. A kémszerek összetételében hasznosnak bizonyult csekély mértékű módosítással az ő előírásukat követtem.

Először tárgyalom az arginintartalom becslésszerű összehasonlítással történő megállapítását magában a burgonyagumóban, utána az arginintartalom pontos meghatározását a burgonyalében. A szükséges vegyszerek mindkét esetben azonosak:

1. *Nátriumhipobromit oldat*: 0,9 ml brómot 100 ml 10%-os nátriumhidroxid oldatban rázogatással oldunk. A műveletet szabadban vagy vegyifülkében végezzük. Az oldatot gumidugóval elzárt üvegben tartjuk; kb. 2 hétig használhatjuk.

2. *Alfa-naftol törzsoldat*: 1,0 g vegytiszta alfanaftolt 100 ml 96 tf%-os alkoholban oldunk. Az oldat üveg dugós sötét barnaszínű üvegben korlátlan ideig eltartható. A vizsgálat napján 1 rész törzsoldatot 3 rész desztillált vízzel hígítunk. A hígított oldat csak egy napig használható.

3. *Uretán oldat*: 2,0 g gyógyszerészeti tisztaságú uretánt 100 ml desztillált vízben oldunk. Üveg dugós üvegben korlátlan ideig eltartható.

### Burgonyagumó arginintartalmának becslése

Minden vizsgálandó burgonyagumóból kb 1 cm vastag szeletet vágunk. A vágás felületén  $2 \times 2$  cm nagyságú, kb.  $1/2$  cm mélységű gödröcskét vágunk vagy kaparunk, a kaparékot eldobjuk. A gödröcskébe pipettával 0,10 ml hígított alfa-naftol oldatot mérünk be és legalább 2 percig állni hagyjuk. Ezután pipettával 0,75 ml uretán oldatot, majd másik pipettával 0,75 ml nátriumhipobromit oldatot adunk a gödröcskébe. A színeképződés azonnal megkezdődik ugyan, de az összehasonlítás megejtéséig 10 percig várunk a szín teljes kifejlődésére, ekkor azonban egy órán belül az összehasonlítást végezzük el, mert egy óra elteltével a szín intenzitása lassan csökkenni kezd.

Az arginintartalom arányában rózsaszíntől erős piros színig reakciót kapunk, amelynek segítségével a gumó arginintartalmát (a szabad aminosavakat + a fehér-

jében a peptidláncok végén helyetfoglaló arginil-gyökök mennyiségét) ismert arginin tartalmú oldat (pl. 1,0 ml vízben 1,0 mg arginin) alikvotjaival ugyanakkor porcelán csészécskékben elkészített reakciók színerősségével összehasonlítva megbecsülhetjük. Közvetlenül is összehasonlíthatjuk az egyes burgonyaszletek színerősségét és így az argininban dúsabb gumókat azonnal kiválogathatjuk.

A gödröcske készítéséhez kényelmes keményfából vagy nem rozsdásodó fémlemezből készített sablont használni, amelyben  $2 \times 2$  cm nagyságú kivágás van.

Helyszíni vizsgálatok számára a reakció kivitelét kényelmesebbé tehetjük, ha a hígított alfa-naftol oldatot és az uretán oldatot a szükségesnek ítélt mennyiségben a megadott arány szerint (azaz minden 0,1 ml hígított alfa-naftol oldatra 0,75 ml uretán oldatot) összekeverjük, természetesen mindig csak a vizsgálat napján. Ekkor a keverékből 0,85 ml-t pipettázunk a gödröcskébe illetve, a porcelán csészécskébe és két perc eltelte után adunk hozzájuk 0,75 ml nátriumhipobromit oldatot. A reakció érzékenysége ezáltal csökken ugyan, de sorozatos munkánál edényzetet és időt takaríthatunk meg ily módon. A kémszerek bemérését meggyorsíthatjuk és kényelmesebbé tehetjük automatikus adagolók használatával.

A reakció színerősségének megállapítása egyesek részére könnyebb lehet oly módon, hogy a 10 perc letelte után a folyadékot a gumószeletek gödröcskéiből kiöntik és a burgonya festett voltának erősségét figyelik meg.

### Burgonyalé arginintartalmának pontos meghatározása

A burgonyagumó nitrogéntartalmú anyaga majdnem teljes mennyiségben a kinyerhető lében oldott állapotban van. A burgonyagumó arginintartalmának meghatározására elegendő a lé arginintartalmát ismerni. A lében az arginin részben szabad aminosav alakjában, részben a fehérjében peptidkötésben van jelen. A szabad aminosav alakjában levő arginint csak úgy határozhatjuk meg, ha a fehérjét előzetesen kicsapjuk és a szűrletből határozzuk meg az arginin mennyiségét, minthogy a peptidláncok végén levő arginil-gyökök is résztvesznek a Sakaguchi-reakcióban. Csak a peptidláncok belsejében levő arginil-gyökök hozzáférhetetlenek a Sakaguchi-reakció számára. A fehérjében kötött arginint a leválasztott fehérje hidrolízise után kapott hidrolizátumban határozzuk meg. A szabad és kötött arginin mennyiségének összeadásával megkapjuk a burgonyalében levő összes arginin mennyiségét. A burgonyagumóban levő lé mennyiségének meghatározásával a burgonyagumó arginintartalmát kiszámíthatjuk.

A burgonyalé előállítására kb. 10 g burgonyát finoman megreszelünk (mi erre a célra üvegből készült almareszelőt használunk), a kapott pépet porcelán mozsárba visszük át és kb. 5 g üveggörrel vagy finom kvarchomokkal mozsártörő segítségével egyenletessé eldörzsöljük (kb. 5 perc). A mozsár tartalmát centrifugacsőbe visszük és percenként 2000 fordulattal kb. 15 percig centrifugáljuk. A kapott levét analitikai szűrőpapirosra leszűrjük.

A szűrt léből centrifugacsőbe mérünk 1,0 ml-t, 4,0 ml desztillált vizet, majd 5,0 ml 10%-os triklórecetsavoldatot adunk hozzá és üvegpálcikával 1–2 percig keverjük. Az üvegbotot néhány csepp (legfeljebb 1 ml) 10%-os triklórecetsav oldattal a centrifugacsőbe lemoszuk, majd legalább 10 percig állni hagyjuk az anyagot. Ezután percenként 2000 fordulattal legalább 10 percig, 1000 fordulattal legalább 30 percig centrifugáljuk. A tiszta oldatot bepárlócsészébe öntjük át, a fehérje-csapadékra pedig 5 ml 5%-os triklórecetsav oldatot adunk. A csapadékot üvegpálcikával szétoszlatjuk és kimosás végett kb. 1 percig kevergetjük. Az üvegpálcikát néhány csepp 5%-os triklórecetsav oldattal a centrifugacsőbe lemoszuk, a

csövet az előbbi módon centrifugáljuk, a tiszta mosófolyadékot a bepárlócsészébe öntjük. A fehérjecsapadék kimosását 5%-os triklórecetsav oldattal megismételjük, a lecentrifugált mosófolyadékot a bepárló csészébe öntjük. A triklórecetsavas oldatot kb. 5 n nátriumhidroxid oldattal fenoltaleinre semlegesítjük, forró vízfürdőn szárazra párologtatjuk. A száraz maradékot 10,0 ml desztillált vízben oldjuk és ebből az oldatból mérünk le 0,5 ml-t a szabad arginin mennyiségének meghatározására.

A centrifugacsőben levő kimosott fehérjére 1 ml 20%-os sósavat adunk, üvegbottal elkeverjük és kihúzott szárú üvegtölcséskén át Szára [3] által leírt hidrolizálócsőbe visszük. Az üvegbottot, centrifugacsövet és tölcserkét 3–4 ízben kis mennyiségű 20%-os sósavval kimossuk. A mosófolyadékot is a hidrolizálócsőbe juttatjuk, ügyelve arra, hogy az összes sósav mennyisége az 5 ml-t ne haladja meg. A csövet leforrasztjuk, majd Szára [3] előírása szerint hidrolizáljuk a fehérjét. A sósav zömétől megszabadított szárazmaradékot 5,0 ml desztillált vízben oldjuk, ebből az oldatból 0,5 ml-t használunk a fehérjében kötött arginin mennyiségének meghatározására.

Az arginin mennyiségének meghatározására 5,0 ml-nél jellel ellátott Vidal-csővekbe (100 × 14 mm-es kémcsövek) legalább század ml pontossággal bemérünk 0,2–0,5 ml meghatározandó oldatot (a bemért oldat mennyisége 0,50 ml-t semmi esetre se haladjon meg!), másik csőbe vakpróbának ugyanannyi desztillált vizet és a csövet negyed óráig jég-víz keverékben hűtjük. Ugyanakkor lehűlés céljából a jeges-vízfürdőbe helyezünk frissen hígított alfa-naftol oldatot, uretán oldatot és nátriumhipobromit oldatot is. A lehűtés után a Vidal-csővekbe mérünk 0,10 ml hígított alfa-naftol oldatot, a csövek tartalmát gyengéd rázással elegyítjük és 2 percig a jeges vízfürdőben állni hagyjuk. Ezen idő eltelte után mindegyik csőbe 0,75 ml uretán oldatot mérünk, összerázzuk és visszahelyezzük a jeges vízfürdőbe. Ezután minden csövet *egyenként* kezelünk: 0,75 ml nátriumhipobomitol-oldatot mérünk bele, a jeges vízfürdőből kivesszük, 3–4 másodpercig rázogatójuk és azonnal felhígítjuk pipettából kb. 0,5 ml-es részletekben hozzáadott szobahőmérsékletű 96%-os alkohollal. Minden hozzáadás után a cső tartalmát összerázzuk és ezt mindaddig folytatjuk, amíg jelig feltöltöttük. Az alkoholt csak ilyen kis részletekben szabad a reakcióelegyhez hozzáadni, különben zavarodás következik be, amelynek eltávolítása centrifugálást igényelne, ami a meghatározást pontatlanná és körülményessé tenné. Az alkohollal jelig beállított csöveket 10 percig állni hagyjuk, hogy a színintenzitás maximumát elérjük és az oldatok szobahőmérsékletet vegyenek fel, azután lehetőleg félórán, de legfeljebb egy órán belül Pulfrich-féle fotométerben (Stufo) S 50 szűrővel 1 cm-es küvettában a vakpróbával szemben az extinkció értékét meghatározzuk. A szín követi Lambert—Beer törvényét. A megadott viszonyok betartása mellett 10–200 mikrogramm (régőbbi elnevezéssel: gamma) arginin határozható meg. Elektromos fotometer használatával a meghatározás kb. tízszeresen érzékenyebbé tehető.

Kalibrációs görbe készítésére olyan törzsoldatot használunk, amelynek minden ml-e 1000 mikrogramm L(+)-arginint tartalmaz, tehát belőle 0,10 ml megfelel 100, 0,2 ml 200 mikrogrammnak. E törzsoldat egy részét pontosan kétszeresére hígítva, ezen oldat ml-enként 500 mikrogramm arginint tartalmaz, tehát belőle az egyes kémcsövekbe 0,12; 0,14; 0,16 és 0,18 ml-t mérünk be, hogy 60, 70, 80 illetve 90 mikrogramm arginin kerüljön meghatározásra. A törzsoldat más részét pontosan tízszeresre hígítva ezen oldatból 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 és 0,50 ml-t mérünk Vidal-csővekbe, hogy 10, 20, 30, 40 illetve 50 mikrogramm arginin által adott színreakció extinkciós értékét meghatározhassuk. Az extinkciós értékeket (mm-papirosan) az ordinátára, a hozzájuk tartozó arginin mikrogramm értékeket pedig



az abszcisszára visszük. Az így nyert összekötő egyenes segítségével az ismeretlen arginintartalmú oldatok arginintartalmát könnyen megállapíthatjuk. A meghatározások pontossága  $\pm 3\%$ .

Módosításom Zalta és Khouvine módszerétől [6] abban tér el, hogy ők az alfa-naftol oldat készítését mindjárt hígított állapotban írják elő, aminek következtében az jégszékényben tartva is csupán legfeljebb 3 napig használható, míg én a tartós alfa-naftol törzsoldat készítését ajánlom, amit csak a meghatározás napján hígítunk négyszeresére. Azonkívül ők legfeljebb 0,2 ml-nyi oldat mennyiségében engedik a meghatározás kivitelét, míg én megállapítottam, hogy a meghatározás pontossága nem szenved, ha a kiindulási oldat mennyisége 0,5 ml-t nem halad meg.

Megállapítottam még azt is, hogy a helyszíni vizsgálatok végzésére kényelmi szempontból megengedhető a szükséges mennyiségű hígított alfa-naftol oldat és uretán oldat előzetes összekeverése és együttes adagolása, csupán a reakció érzékenységének csökkenése árán.

Weber [5] megemlíti, hogy az arginin meghatározását zavarja a tirozin, triptofán, hisztidin, ammonsók, kreatin és kreatinin jelenléte. Ezért erre vonatkozólag is végeztem kísérleteket. Megállapítottam, hogy tirozin, triptofán és hisztidin a leírt kísérleti körülmények mellett ibolyás-szint adnak, amely az alkohol hozzáadására sárgába csap át, e színnek S 43 szűrő használata felel meg. Hisztidin 1100, tirozin 700, triptofán 400 mikrogramm mennyiségig (a meghatározandó oldat-mennyiségben) egy órán belül történő leolvasásnál a legkisebb mértékig sem zavarják az arginin meghatározását. Hosszabb idő múlva (pl. másnapra) már nagy extinkciót mutatnak, ellentétben az argininnal, amelyik egy óra eltelte után erősségéből veszíteni kezd. Kreatin és kreatinin 900 mikrogramm mennyiségben egy órán belül leolvasva nem zavar. Ammonklorid oldata 1400 mikrogramm N mennyiségig számbavehető eltérést nem okoz, a keletkezett sárga szín (2000 mikrogrammnál nagyobb nitrogén mennyiségeknél halvány rózsaszín) állás közben rohamosan gyengül, zavaró befolyása kisebbedik. Minthogy a Sakaguchi-reakció ezen alakjában  $pH_2$  és  $pH_{12}$  határok közt a hidrogénionkoncentráció változásával szemben nem érzékeny, nagyobb mennyiségű ammonsó zavaró befolyását könnyen kiküszöbölhetjük, ha a hidrolizátumot alkálilúggal gyengén meglúgosítjuk és a keletkező ammoniát felfőzéssel vagy levegő átbuborékoltatásával elűzzük.

1. táblázat  
Hat burgonyafajta arginintartalma

Burgonyafajta	Szabad	Kötött	Összes
	arginin mg/100 ml		
Aranyalma .....	8	61	69
Ella .....	30	60	90
Gülbaba .....	61	42	103
249 .....	42	45	87
278 .....	21	42	63
502 .....	44	52	96

Érdekesség szempontjából közlöm hat (idei termésű) burgonyafajta arginintartalmára vonatkozó, a közölt módszerrel végzett meghatározásaink eredményét. Az arginin mennyiségét 100 ml lében mg-okban fejeztem ki és az 1. táblázatban foglaltam össze.

## Összefoglalás

A burgonyagumó arginintartalma a helyszínen összehasonlítással megbecsülhető vékony szeletébe vájt gödröcskében egy módosított, érzékeny Sakaguchi-reakció segítségével. Egyenlő nagyságú gödröcske készítését könnyen kezelhető sablón használatával érhetjük el. Burgonyalében a szabad és kötött arginin mennyiségét ugyanezzel a reakcióval pontosan és gyorsan meghatározhatjuk. Pulfrich-fotométert használva a meghatározás határértékei 10–200 mikrogramm arginin  $\pm 3\%$  pontossággal. Ammonsók csak 1400 mikrogrammnál nagyobb nitrogén mennyiségben zavarnak, viszont ilyen esetben az oldat meglúgosításával elűzhetők.

Érkezett : 1954. október 22.

## Irodalom

- [1] Acher, R. & Crocker, Ch.: Biochim. Biophys. Acta. 9. 704. 1952.
- [2] Sakaguchi: J. Biochem. Japan. 5. 25. 1925. Cit.: Winton, A. L. & Barber Winton, K.: The Analysis of Foods. J. Wiley & Sons. New-York. 1945.
- [3] Szára, I.: Kísér. Orvostud. 3. 71. 1951.
- [4] Weber, C.: J. Biol. Chem. 86. 217. 1930.
- [5] Weber, C.: J. Biol. Chem. 88. 353. 1930.
- [6] Zalta, I. P. & Khouvine, J.: Bull. Soc. Chim. Biol. 35. 697. 1953.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АРГИНИНА В КАРТОФЕЛЕ

И. Корпаци

Институт по исследованию питания и питательных веществ, Будапешт (Венгрия)

## Резюме

Содержание аргинина в картофеле можно быстро определить на месте методом сравнения, делая в тонких срезах картофеля небольшое отверстие (2X2X0,5 см.) с помощью реакции Сакагучи, или методом усовершенствованным Залта и Ковуине, или более чувствительным методом, предложенным автором.

В картофеле, с помощью шаблона, делается небольшое отверстие (2X2) и количество свободного и связанного аргинина в соке картофеля определяется этим методом быстро и точно. С помощью фотометра типа Пульфрихта можно определить содержание аргинина от 10 - 200 микрограмма с точностью до  $\pm 3\%$ . С помощью электрофотометра чувствительность повышается в 10 раз. Соли аммиака мешают определению, если в них содержится 1400 микрограмма азота, но они легко удаляются при ошелачивании и кипячении. Гистидин не мешает определению если его содержится в растворе ниже чем 1100, тирозин 700, триптофан 400, креатин и креатинин 900 микрограммов.

Таблица 1. Содержание свободного, связанного и общего аргинина в 6-ти сортах картофеля в мг/100 мл.

## Estimation of the Arginine Content in Potatoes and Potatojuice

I. KORPÁČZY

Institute for Alimentation and Nutrition, [Budapest (Hungary)]

## Summary

The arginine content of potato tubers may be estimated on the field by comparing them with the Sakaguchi-reaction modified and made more sensitive by Zalta and Khouvine, slightly altered by the author, performed in a small hollow (2X2X0.5 cm) by aid of a handy stencil. The quantity of free and bound arginine in the potatojuice is easily and quickly estimable by the same reaction:

Using a Pulfrich-photometer the range of testing the arginine content is between 10—200 micrograms, the exactness  $\pm 3$  p. h. With electrospectrophotometers a tenfold sensitivity may be arrived at. Ammoniacal salts interfere only in quantities over 1400 microgram nitrogen content, but in such a case they are easily expelled by alkalizing and heating or aerating the solution. Hystidine does not interfere in quantities not exceeding 1100, tyrosine 700, tryptophane 400, creatine and creatinine 900 micrograms in the aliquot to be tested.

Table 1. Free, bound and total arginine content of six potato varieties.

## Bestimmung des Arginingehaltes im Kartoffel und Kartoffelsaft

I. KORPÁČZY

Forschungsinstitut für Lebensmittel, Budapest (Ungarn)

### Zusammenfassung

Mittels der Sakaguchi-Reaktion kann der Arginingehalt der Kartoffelknollen schon auf dem Felde schätzungsweise bestimmt werden. Ich habe das durch Zalta und Khouvine bereits modifizierte, empfindlicher gestaltete Sakaguchi-Reaktionsverfahren noch meinerseits etwas abgeändert. Zu dieser vergleichenden Reaktionsprüfung werden dünne Kartoffelscheiben geschnitten und in diesen dann kleine Vertiefungen ( $2 \times 2 \times 0,5$  cm) ausgehöhlt. Eine gleichmässige Grösse dieser Vertiefungen kann durch Anwendung einer Handschablone erzielt werden. Mit dem gleichen Reaktionsverfahren kann auch im Kartoffelsaft die Menge des freien und gebundenen Arginins leicht und rasch bestimmt werden. Wenn zur Prüfung Pulfrich-Photometer benützt wird, liegen die Grenzwerte der Bestimmung — bei 3% Sicherheit — zwischen 10—200 Mikrogramm. Mit Elektrospektrophotometer kann die Sicherheit auf das Zehnfache erhöht werden. Die Ammoniaksalze üben nur in dem Falle eine störende Wirkung aus, wenn der Stickstoffgehalt 1400 Mikrogramm übersteigt. In diesem Falle können aber diese Salze durch Alkalisierung, Erhitzung oder Lüftung der Lösung ganz leicht vertrieben werden. Durch die nachstehenden Substanzen wird die Reaktion nur in dem Falle gestört wenn dieselben in grösseren Mengen in der zu prüfenden Teilmenge des Saftes vorhanden sind. In diesem Sinne gestalten sich die Mengengrenzwerte dieser Substanzen wie folgt: Histidin über 1100, Tyrosin über 700, Tryptophan über 400, Creatin und Creatinin über 900 Mikrogramm.